



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI - UNIVATES
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS, LIPASE, PROTEASE E
QUITINASE DE FUNGOS PROVENIENTES DO SOLO DO BIOMA
PAMPA**

Joice da Silva Varreira

Lajeado, novembro de 2018

Joice da Silva Varreira

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS, LIPASE, PROTEASE E
QUITINASE DE FUNGOS PROVENIENTES DO SOLO DO BIOMA
PAMPA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas, da Universidade do Vale do Taquari
- Univates, como parte da exigência da
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Liberato da
Silva

Lajeado, novembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para enfrentar essa grande etapa.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Liberato da Silva, pela orientação e apoio para realização desse trabalho, e pelas palavras, “Vai dar tudo certo!”, palavras essas que me ajudaram a manter a calma nos momentos difíceis.

A Prof.^a Dr.^a. Mônica Jaquetti Maciel, que mesmo de licença maternidade estava sempre à disposição para esclarecer dúvidas.

As bolsistas de iniciação científica do Projeto de Pesquisa Microbiologia em Sistemas Ambientais Sustentáveis, Amanda Luisa Ströher e Amanda Ianael Barth que com muito empenho e dedicação me auxiliaram na parte prática desse trabalho.

Ao meu irmão que me socorreu quando eu precisava de casca de camarão para alguns testes, comprou e tirou as cascas para mim.

A toda minha família, pai, mãe, esposo e filhos caninos que sempre estiveram ao meu lado.

E a todas as pessoas que de forma direta ou indiretamente participaram para a realização desse trabalho.

Meu Muito Obrigada!

RESUMO

Os fungos desempenham um importante papel na natureza como decompositores de matéria orgânica, além disso, são excelentes produtores de enzimas, comumente utilizadas por indústrias para produção de medicamentos, bebidas, alimentos e controle biológico. Assim este trabalho teve como objetivo avaliar cinco metodologias diferentes, sendo três metodologias de lipases, uma de protease e uma de quitinase para avaliação de produção enzimática com quatro gêneros de fungos provenientes do solo do Bioma Pampa, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Os experimentos desse trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia Didático da Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado, RS. De acordo com as metodologias empregadas para avaliação enzimática, os meios de cultura foram preparados e distribuídos em placas de Petri. Logo após a solidificação dos meios, os isolados fúngicos foram inoculados em quatro pontos das placas e incubados em estufa a temperatura de 25C° a 30C° por um período de 3 a 10 dias, conforme a metodologia para avaliação da formação de halos de degradação ou precipitação em torno das colônias. Todos os quatro gêneros de fungos produziram uma ou mais das três enzimas testadas, lipase, protease ou quitinase. *Acremonium* sp. apresentou resultados positivos para as três metodologias de lipase e para metodologia de protease, *Aspergillus* sp. apresentou resultado positivo somente para uma das metodologias de lipase, *Fusarium* sp. apresentou positividade somente para a metodologia protease, *Penicillium* sp. apresentou resultados positivos para as três metodologias de lipase e para metodologia de quitinase. Concluiu-se que os fungos *Acremonium* sp. e *Penicillium* sp. foram os dois gêneros que mais apresentaram atividade enzimática nas metodologias avaliadas.

Palavras – chaves: *Acremonium*. Enzimas. Fungos Filamentosos. *Penicillium*

ABSTRACT

Fungi play an important role in the nature as decomposers of organic matter, besides they are excellent enzyme producers and are commonly used to produce medicine, drinks, food and biological control. This study aims to test five different methodologies, three being lipase methodologies, one being a protease and one being a quitinase methodology for evaluating the enzymatic production of four genus of fungi from the soil of the Pampa Biome, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.. The experiments of this study were performed in the Didactic Laboratory of Microbiology of the University of the Taquari Valley, Univates, Lajeado, RS. According to the applied methodologies for enzymatic evaluation the culture medium were prepared and distributed in petri dishes. After the solidification of the medium the isolated fungi were inoculated in four posts of the dishes and incubated in oven in 25°C to 30°C for 3 to 10 days, according to the methodology for evaluation of the formation of degradation or precipitation halo around the colonies. All the four genus produced one or more of the three tested enzymes, lipase, protease or quitinase. *Acremonium* sp. showed positive results for the three lipase methodologies and for the protease methodology, *Aspergillus* sp. was positive only for the lipase methodology 2, *Fusarium* sp. was positive only for the protease methodology, *Penicillium* sp. was positive for the three lipase methodologies and the quitinase methodology. The conclusion was that the genus *Acremonium* sp. and *Penicillium* sp. were the ones that showed the most enzymatic activity.

Keywords: *Acremonium*. Enzymes. Fillamentary Fungi. *Penicillium*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Na imagem <i>Acremonium</i> sp. crescido em meio de ágar Sabouraud Dextrose(A) e vista microscópica de conídios através do microcultivo (B)	13
Figura 2 - Na imagem <i>Aspergillus</i> sp. crescido em meio de ágar Sabouraud Dextrose (A), e vista microscópica de conidióforos através do microcultivo (B).....	14
Figura 3 - Na imagem <i>Fusarium</i> sp. crescido em meio de ágar Sabouraud Dextrose (A) e vista microscópica de conidióforos através de microcultivo (B).....	15
Figura 4 - Na imagem <i>Penicillium</i> sp. crescido em meio de ágar Sabouraud Dextrose (A) e vista microscópica de conidióforo verticilado através de microcultivo (B)	16
Figura 5 - Fluxograma da extração de quitina sem tratamento.	24
Figura 6 - Presença de halos alaranjados, evidenciando a atividade de lipase em <i>Penicillium</i> sp. (A) e <i>Acremonium</i> sp. (B)	26
Figura 7 - Presença de halos translúcidos, evidenciando a atividade de lipase em <i>Aspergillus</i> sp. (A), <i>Acremonium</i> sp. (B) e <i>Penicillium</i> sp. (C).....	27
Figura 8 - Presença de halos translúcidos, evidenciando a atividade de lipase em <i>Acremonium</i> sp (A) e <i>Penicillium</i> sp. (B)	27
Figura 9 - Presença de halos translúcidos, evidenciando a atividade de protease em <i>Acremonium</i> sp (A) e <i>Fusarium</i> sp. (B)	28
Figura 10 - Presença de halos translúcidos, evidenciando a atividade de quitinase em <i>Penicillium</i> sp. (A) e (B)	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3.1 Características Gerais dos Fungos	11
3.1.1 <i>Acremonium</i> sp.	12
3.1.2 <i>Aspergillus</i> sp.....	13
3.1.3 <i>Fusarium</i> sp.	14
3.1.4 <i>Penicillium</i> sp.	15
3.2 Bioma Pampa.....	16
3.3 Enzimas	17
3.4 Lipases	17
3.5 Proteases	18
3.6 Quitinases	19
4 MATERIAL E METÓDOS.....	20
4.1 Lipase 1	21
4.2 Lipase 2	21
4.3 Lipase 3	22
4.4 Protease 1	23
4.5 Quitinase 1	23
5 RESULTADOS	25
5.1 Lipases	25
5.2 Protease	28
5.3 Quitinase	28
6 DISCUSSÃO	30

7 CONCLUSÃO	31
--------------------------	-----------

REFERÊNCIAS.....	32
-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são encontrados nos mais diversos ambientes, são amplamente diversificados em tamanhos, formas, cores, hábitos e habitats. São extremamente importantes na natureza como decompositores de matéria orgânica, podem ser utilizados para produção e fabricação de alimentos, medicamentos, produção enzimática e controle biológico de pragas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Assim, cada Bioma possui uma diversidade fúngica específica, principalmente em solos, que caracterizam a composição do ambiente.

Segundo Bolbrini et al. (2010), o Estado do Rio Grande do Sul possui uma grande variedade de classes de solos, devido a ampla riqueza de condições geológicas e geomorfológicas encontradas no Estado, principalmente dentro do Bioma Pampa. Bioma este, que no Brasil restringe-se ao Estado do Rio Grande do Sul, cobrindo a metade sul do território gaúcho (BOLRINI et al., 2010).

Segundo alguns estudos sobre o Bioma Pampa, a biodiversidade microbiana fúngica é muito grande, mas infelizmente sabe-se pouco sobre o assunto (LUPATINI et al., 2013), este fato, mostra a importância de trabalhos como este para ampliar as possibilidades na biotecnologia.

Este trabalho avaliou a produção de enzimas, lipase, protease e quitinase de quatro gêneros de fungos, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., provenientes do solo do Bioma Pampa do município de Pantano Grande,

RS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar cinco metodologias diferentes de produção enzimática, lipase, protease e quitinase, para quatro gêneros de fungos selecionados, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., provenientes do solo do Bioma Pampa do município de Pantano Grande, RS.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar três metodologias diferentes de produção enzimática pra lipase, uma para protease e uma para quitinase;
- b) Identificar os gêneros com melhor produção enzimática.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Características Gerais dos Fungos

Os fungos são seres eucariotos, podem ser unicelulares, ou pluricelulares, microscópicos ou macroscópicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Um exemplo de fungos unicelulares são as leveduras, e em grande parte os fungos são filamentosos, pluricelulares, que por sua vez, formam hifas septadas ou cenocíticas que se ramificam (PUTZKE; PUZTKE, 1998).

Estes seres vivos são encontrados em diversos ambientes, são amplamente diversificados em tamanhos, formas, cores, hábitos e habitats. Reproduzem – se de forma sexuada ou assexuada (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). A reprodução assexuadamente ocorre pela fragmentação de suas hifas ou pela formação de esporos produzidos por mitose e subsequente divisão celular. Já na reprodução sexuada, ocorre formação de esporos sexuais que passam por três etapas, plasmogamia, cariogamia e meiose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os fungos alimentam-se através da absorção, secretando enzimas extracelulares que digerem o alimento. Em outros casos, o micélio emite haustórios (TORTORA, 2013), sendo que essas estruturas são órgãos de absorção que tem sua origem nas hifas de fungos parasitas. Os haustórios penetram no hospedeiro e absorvem os nutrientes através do envaginamento da membrana plasmática (PUTZKE; PUZTKE, 2004).

São organismos importantes na decomposição de matéria orgânica nos ecossistemas, principalmente nas florestas, degradando madeira e devolvendo

nutrientes ao ambiente (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Além disso, alguns fungos são utilizados pelas indústrias farmacêuticas para produção de medicamentos como a penicilina, e nas indústrias alimentícias, para produção de bebidas fermentadas como vinhos e cervejas, fabricação alguns tipos de queijos e pães e produção de enzimas com grande interesse industrial. Indústrias especializadas utilizam os fungos como controle biológico de pragas como no caso dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Cordyceps barberi* Giard e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok para o controle da broca-da-cana (PINTO et al. 2006).

3.1.1 Acremonium sp.

Segundo Braz et al. (2009), *Acremonium* sp. corresponde a sapróbios do solo, ou seja, são decompositores de matéria orgânica do solo dispersos no meio ambiente. Este gênero possui formação de fiálides diretamente do micélio e separadas por um septo, com formação de conídios no topo da mesma, geralmente agrupados (FIGURA 1), (FAIA, 2011).

Acremonium sp. é utilizado dentro da biotecnologia por indústrias farmacêuticas para fabricação de medicamentos como o antibiótico cefalosporina, (GERRA et al., 2011).

Figura 1 - Na imagem *Acremonium* sp. crescido em meio de ágar Sabouraud Dextrose(A) e vista microscópica de conídios através do microcultivo (B)



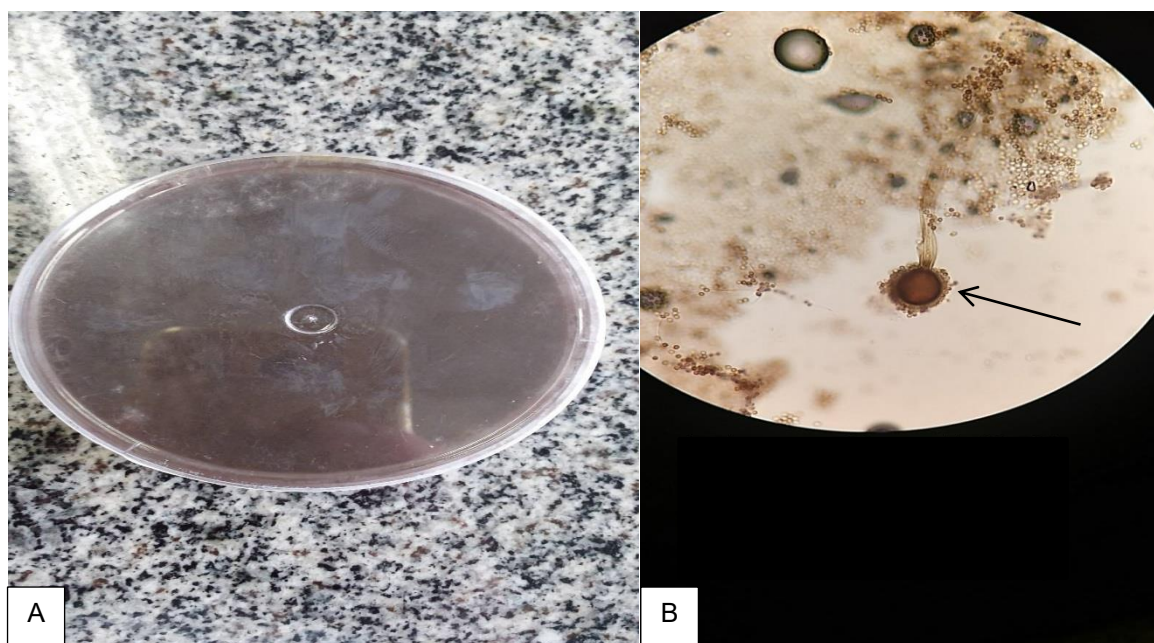
Fonte: Projeto de Pesquisa Microbiologia em Sistema Ambientais Sustentáveis, 2018.

3.1.2 *Aspergillus* sp.

O *Aspergillus* sp. é o mais comum entre os fungos filamentosos, espécies desse grupo são encontrados por todo o globo, e nos mais diversos ambientes, como água, solo, ar, animais e plantas, possuem coloração variada, com tons de verde, amarelo, cinza, marrom, preto e branco. *Aspergillus* sp. possui conidióforo não septado e dilatado, no topo possui vesícula, onde se formam fiálides (FIGURA 2) (FAIA, 2011).

Aspergillus sp. é comumente utilizado para fabricação de queijos, pois auxilia na coagulação da proteína caseína, pelas indústrias cervejeiras, têxtil, papeleira, de detergentes e pelas indústrias de refrigerantes para produção de ácido cítrico (GERRA et al., 2011).

Figura 2 - Na imagem *Aspergillus* sp. crescido em meio de ágar Sabouraud Dextrose (A), e vista microscópica de conidióforos através do microcultivo (B)



Fonte: Projeto de Pesquisa Microbiologia em Sistemas Ambientais Sustentáveis, 2018.

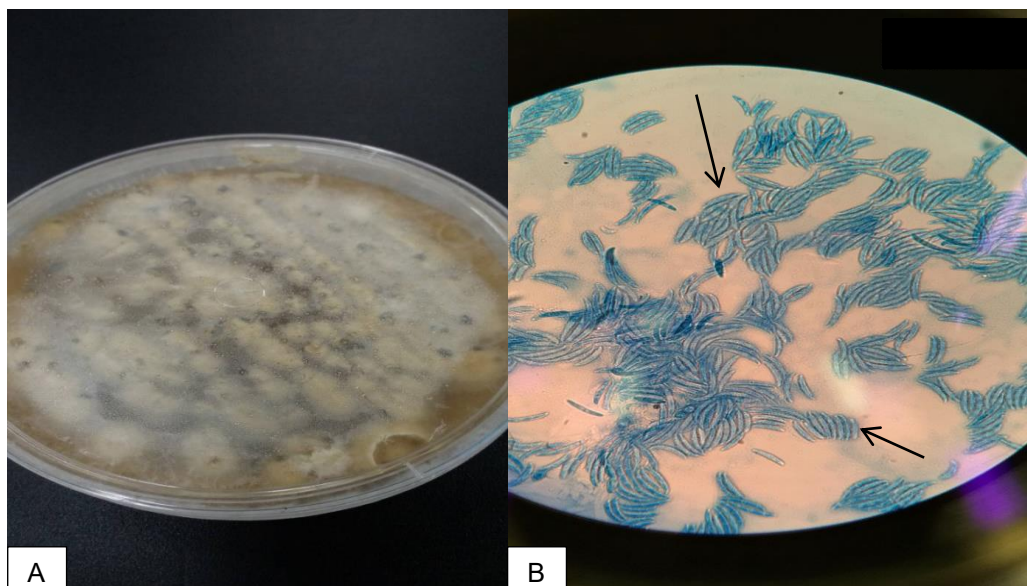
3.1.3 *Fusarium* sp.

O *Fusarium* sp. é muito *diversificado* podendo ocorrer sobre plantas e algumas classes de animais. Esse gênero desenvolve-se muito bem em meios de cultura, possui várias colorações que vão do amarelo, laranja, vermelho ou roxo (ALVES, 1998).

Segundo Alves (1998), *Fusarium* sp. apresenta conidióforos espalhados ou agregados, podendo ser grandes, curvados, septados, em formato de canoa (FIGURA 3), ou ainda, ovoides ou cilíndricos produzidos sobre fiálides alongadas em um tipo de muco ou secos.

O *Fusarium* sp. é utilizado principalmente para produção enzimática de lipases (MAIA et al., 2001).

Figura 3 - Na imagem *Fusarium* sp. crescido em meio de ágar Sabouraud Dextrose (A) e vista microscópica de conidióforos através de microcultivo (B)



Fonte: Projeto de Pesquisa Microbiologia em Sistemas Ambientais Sustentáveis, 2018.

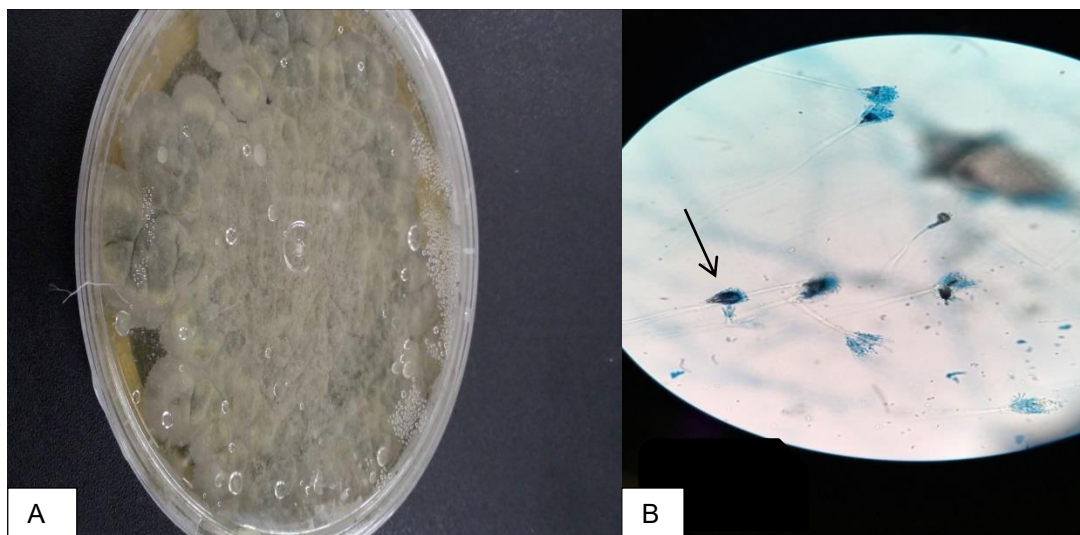
3.1.4 *Penicillium* sp.

Conforme Jesus et al. (1999), *Penicillium* sp. é considerado um gênero universal de fungos. A maioria das espécies são saprófitas e na maioria das vezes são encontradas no solo, vegetação em decomposição, sementes e grãos.

O *Penicillium* sp. possui conidióforo verticilado, com formação de fiálides (FIGURA 4) (FAIA, 2011).

Penicillium sp. é utilizado para produção de medicamentos como a penicilina e produção de alguns tipos de queijos com bolores, como *camembert* e *roquefort*. O papel dos fungos na maturação destes queijos está relacionado com a produção de enzimas como lipases e proteases, as quais irão atuar sobre as proteínas e as gorduras do queijo, garantindo assim aromas e sabores diferenciados e bem característicos. (CHAVES, 2006).

Figura 4 - Na imagem *Penicillium* sp. crescido em meio de ágar Sabouraud Dextrose (A) e vista microscópica de conidióforo verticilado através de microcultivo (B)



Fonte: Projeto de Pesquisa Microbiologia em Sistemas Ambientais Sustentáveis, 2018.

3.2 Bioma Pampa

O Bioma Pampa abrange o território brasileiro, uruguaio e argentino. No Brasil, restringe-se a metade sul do estado do Rio Grande do sul com distintas formações vegetacionais, tais como, campos, serras, planícies, morros rupestres e coxilhas (BOLRINI et al., 2010).

O Bioma Pampa apresenta uma ampla variedade vegetal, animal e microbiana, e possui uma das mais belas paisagens do estado (BOLRINI et al., 2010), mas, infelizmente, pouco protegido. Nos últimos anos, áreas de Bioma Pampa foram substituídas por plantações de espécies exóticas como *Acacia* spp., *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. ou culturas de arroz e soja (PILLAR et al., 2009).

O Bioma Pampa apresenta um amplo patrimônio natural, genético e cultural de importância nacional e global. Também é neste bioma que se encontra a maior parte do aquífero Guarani. (BOLRINI et al., 2010).

Os poucos estudos referentes a este bioma indicam que apesar da sua grande biodiversidade é o bioma menos conhecido, principalmente em relação a biodiversidade de microrganismos fúngicos (LUPATINI et al., 2013).

3.3 Enzimas

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos no organismo dos seres vivos sejam eles, plantas ou animais (CAMPBELL, 2000). Todas as enzimas são proteínas, salvo um diminuto grupo de moléculas de RNA catalíticas (NELSON; COX, 2014).

Para evitar maiores problemas com a nomenclatura das enzimas a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular criou algumas regras de classificação funcional sistemática e de nomenclatura, agora as enzimas são nomeadas conforme a reação química que catalisam, ou seja, o nome do substrato mais terminação ase (VOET; VOET; PRATT, 2002).

Para Sejas (2002), as enzimas fúngicas são os produtos microbianos mais utilizados na indústria biotecnológica, indústrias farmacêuticas com produção de medicamentos, sendo muito utilizada no processamento e produção de alimentos, produção de detergentes biológicos, indústria têxtil e controle biológico.

3.4 Lipases

As enzimas lipases são responsáveis pela quebra dos lipídeos como óleos e gorduras existentes na superfície de alguns seres vivos, para posterior metabolização pelos microrganismos (ALVES, 1998). As lipases são glicerol éster hidrolases que catalisam a quebra de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos glicerol e ácidos graxos (CAMPBELL, 2000).

A lipase tem sua ação exclusivamente na interface lipídeo-água, e a concentração de substrato é que determina a taxa de quebra. Animais, plantas e microrganismos são produtores eficientes de lipases, mas as de origem microbiana

são as mais versáteis e conseguem fazer um grande número de reações, como hidrólise, esterificação e alcoólise (SEJAS, 2002).

As lipases apresentam grande relevância médica, principalmente em relação à arteriosclerose e à hiperlipidemia, uma vez que alguns produtos de sua atuação têm papel crucial na regulação e no metabolismo celular (FAROOQUI et al. 1987). Segundo Jaeger & Eggert, 2002, a lipase é uma enzima extremamente versátil, sendo utilizadas em aplicações industriais, como na fabricação de laticínios, indústrias de couro e detergentes, produção de cosméticos e fármacos.

3.5 Proteases

As proteases, além de estarem envolvidas nos processos de formação e germinação dos esporos, têm funções nutricionais importantes, sendo capazes de hidrolisar as cadeias polipeptídicas em moléculas menores, que são absorvidas pelas células (ALVES, 1998).

As proteases podem ser divididas em dois grupos, exopeptidases que atuam sobre ligações peptídicas amino ou carboxiterminal, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas internas nos peptídeos. Além disso, as proteases podem ser divididas em quatro classes diferentes:

a) Serinas proteinases que são caracterizadas pela presença de resíduo de serina no seu centro ativo, o qual é o sítio de ligação do substrato;

b) Cisteínas proteinases é um resíduo essencial de cisteína responsável pela ligação ao substrato;

c) Proteinases aspárticas possuem um ou dois resíduos de aspárticos no seu centro ativo e tem participação na catálise;

d) Metaloproteinases possuem íons metais, usualmente o zinco, em seu sítio ativo (NORTH, 1982; KHAN e ROUFOGALIS, 1994).

As proteases de origem microbiana têm um papel muito importante, pois podem atuar sobre diversos substratos específicos, podendo ser utilizadas em

diversas áreas da biotecnologia (BARATA et al., 2002). Além disso, têm importância comercial, 75% dessas proteases são usadas em detergentes, curtimento de couros e processamento de alimentos como pães e queijos (PARIS, 2008).

3.6 Quitinases

A quitina é um componente encontrado na carapaça de crustáceos, insetos e na parede celular de fungos, apesar da grande produção de resíduos que contém quitina, esse polímero é pouco utilizado, tanto na produção de alimentos para outras espécies animais quanto para purificação da quitina em uso em laboratórios (BALDONI, 2016).

As quitinases, por sua vez, fazem a hidrólise da quitina, a qual é feita por um sistema quitinolítico que envolve duas hidrolases (quitinase e quitobiase) que atuam sequencialmente. As quitinases são produzidas em grande quantidade por fungos, entretanto a produção e diversidade variam entre as espécies (ALVES, 1998).

Essas enzimas possuem uma grande aplicabilidade no controle biológico de fungos fitopatogênicos e na indústria farmacêutica (GALANTE, 2008).

4 MATERIAL E METÓDOS

Os experimentos desse trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia Didático da Universidade do Vale do Taquari – Univates, Lajeado, RS. Os isolados fúngicos foram isolados de diferentes pontos do solo do município de Pantano Grande, no Estado do Rio Grande do Sul, durante a execução do Projeto de Pesquisa “Microbiologia em Sistemas Ambientais Sustentáveis” da Universidade do Vale do Taquari - Univates, sendo os mesmos doados para realização deste trabalho.

Os gêneros selecionados estavam devidamente isolados. Foram realizadas amostras em meio ágar Sabouraud Dextrose de alguns destes isolados para serem utilizados neste trabalho, depois de 7 dias em estufa a 27 C°, as amostras foram preparadas para realização de microcultivo, para devida identificação morfológica dos mesmos. Após a identificação a nível de gênero, as amostras de interesse foram utilizadas no experimento.

Para este trabalho foram testadas cinco metodologias diferentes de avaliação enzimática, três lipases, enumeradas de 1 a 3, uma protease e uma quitinase.

Todas as cinco metodologias foram testadas para quatro gêneros de fungos, sendo eles, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Os testes foram realizados em triplicata.

A produção enzimática foi evidenciada pela formação de halos alaranjados ou translúcidos ao redor das colônias com a necessidade ou não de solução reveladora para visualização, dependendo da metodologia.

4.1 Lipase 1

Para a metodologia Lipase 1 foram utilizados os seguintes materiais

- 0,001% (m/v) Corante Rodamina;
- 1% (v/v) Óleo de oliva;
- 0,01% (v/v) Tween 80;
- 9,75g Ágar Batata Dextrose;
- 250 ml Água destilada;

Foram preparadas placas de Petri com o meio de cultura, depois de sólido, os esporos dos fungos crescidos em meio Ágar Sabouraud foram inoculados em quatro pontos nas placas e incubados a temperatura de 25°C, por um período de 5 dias. O corante Rodamina foi utilizado para evidenciar a produção de lipases no meio de cultura.

A produção de lipase foi evidenciada pelo aparecimento de fluorescência alaranjada quando as placas foram submetidas à irradiação com luz UV a 365 nm (KOUKER; JAEGER, 1987).

4.2 Lipase 2

Para a metodologia Lipase 2 foram utilizados os seguintes materiais

- 2,5 ml Substrato Tween 20;
- 2,5 g Peptona;
- 1,25g Cloreto de sódio;
- 0,025g Cloreto de cálcio;
- 5g Ágar Batata Dextrose;
- 250ml Água destilada;
- pH 6,0;

O Tween 20 foi esterilizado separadamente por 15 minutos a 1 atm. de pressão e 2,5 ml adicionado a 250 ml de meio esterilizado e resfriado. Após distribuição em placas e solidificação do meio os esporos fúngicos foram inoculados em quatro pontos das placas e encubados em estufa por um período de 7 a 10 dias

em uma temperatura de 28°C. A reação enzimática positiva para lipase foi formação de cristais de sal do cálcio do ácido láurico liberado pela enzima ou a formação de zonas claras em volta da colônia em razão da completa degradação do sal do ácido gorduroso, adaptado de (HANKIN, ANAGNOSTAKIS, 1975; FERNANDES, 2009).

4.3 Lipase 3

Para metodologia de Lipase 3, o meio de cultura para visualização da lipase adaptado de (CRUZ, 1985; SEJAS, 2002), houve a necessidade de preparar uma emulsão com o lipídio. A emulsão e o meio foram preparados separadamente.

Preparo de emulsão:

- 0,25g margarina;
- 5g Agar Batata Dextrose;
- 25 ml Água destilada.

Preparo do meio:

- 1,42g Peptona;
- 0,85g Extrato de carne;
- 225 ml Água destilada.

Procedimento:

A emulsão foi misturada, esterilizada a 121 °C 1 atm., resfriada a 50°C e agitada vigorosamente. O meio foi preparado e esterilizado a 121°C a 1atm., resfriado a aproximadamente 50°C e acrescentado 25 ml da emulsão. Foram agitados e distribuídos em placas de Petri, depois de sólido os esporos fúngicos foram inoculados em quatro pontos das placas. A função enzimática foi observada após 7 dias de incubação em estufa por aproximadamente 28°C, a atividade enzimática positiva ocorreu pela formação de halos em torno das colônias (CRUZ, 1985; SEJAS, 2002).

4.4 Protease 1

Para a metodologia Protease 1 foram utilizados os seguintes materiais

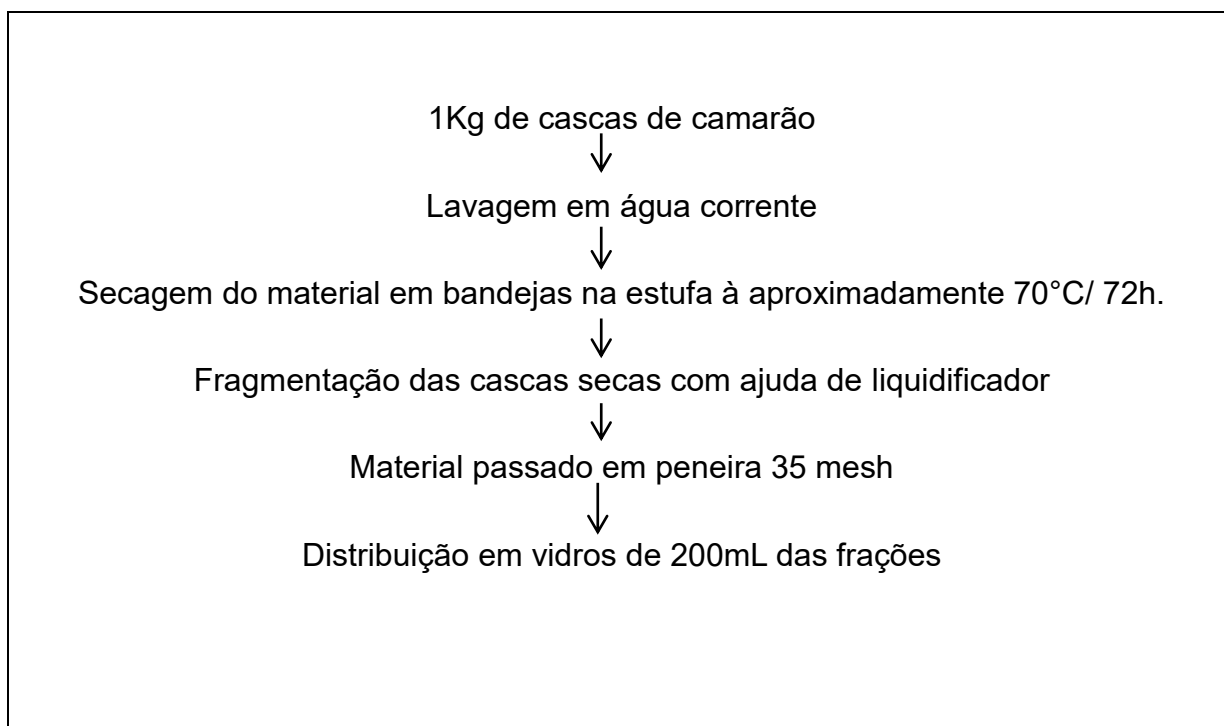
- 0,05 g Sulfato de Magnésio;
- 0,025 g Cloreto de Sódio;
- 0,1 g Extrato de Leveduras;
- 0,1 g Fosfato de Potássio Monobásico;
- 0,025 g Fosfato de Potássio Dibásico;
- 3,75g Ágar Bacteriológico;
- 4g Leite em Pó Desnatado;
- 250ml Água destilada.

Após o preparo do meio, o mesmo foi esterilizado a 121 °C 1 atm. de pressão. Em seguida, distribuído em placas de Petri, depois de sólido os esporos fúngicos foram inoculadas em 4 pontos das placas, e incubadas por 72 h a 27 °C em estufa. A presença dos halos transparentes foi verificada pelo uso de ácido acético 5%, adaptado de (OLIVEIRA et al., 2012).

4.5 Quitinase 1

Para a metodologia de avaliação de quitinase, a quitina foi preparada com adaptações do que foi descrito no fluxograma proposto por Cruz (1985).

Figura 5 - Fluxograma da extração de quitina sem tratamento.



Fonte: Cruz, 1985.

Para a metodologia Quitinase 1 foram utilizados os seguintes materiais

- 2g de quitina da casca de camarão;
- 0,195g de Nitrato de Amônia;
- 3,75g de Agar Batata Dextrose;
- 250ml água destilada.

Os isolados foram colocados nas placas com o meio de cultura e incubados a temperatura de 28 a 30°C por um período de 10 dias. A função enzimática foi observada pela formação de halos em torno das colônias, adaptado de (CATTELAN, 1999).

5 RESULTADOS

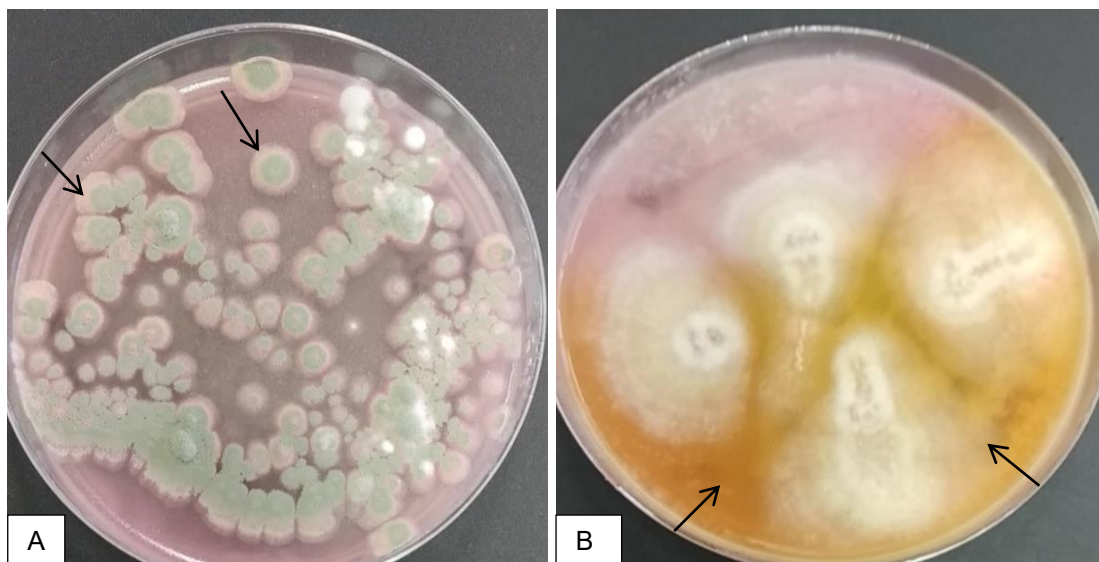
Dos quatro gêneros de fungos testados nos experimentos, todos eles em algum momento, apresentaram resultados positivos em uma ou mais metodologias testadas. Ou seja, todos os quatro gêneros produziram uma ou mais enzimas.

5.1 Lipases

As três metodologias de lipases apresentaram resultados positivos com três dos quatro gêneros de fungos testados, *Acremonium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

A Lipase 1 apresentou positivo para *Acremonium* e *Penicillium*, resultado observado pela formação de halos alaranjados em torno das colônias de fungos (FIGURA 6).

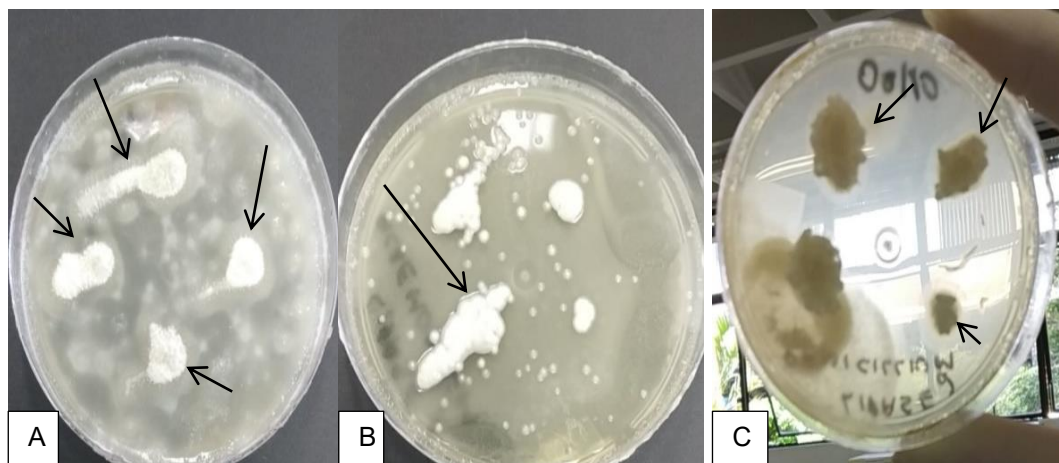
Figura 6 - Presença de halos alaranjados, evidenciando a atividade de lipase em *Penicillium* sp. (A) e *Acremonium* sp. (B)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A Lipase 2 apresentou positivos para *Acremonium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, os resultados foram observados pela formação de halos translúcidos em torno das colônias de fungos (FIGURA 7).

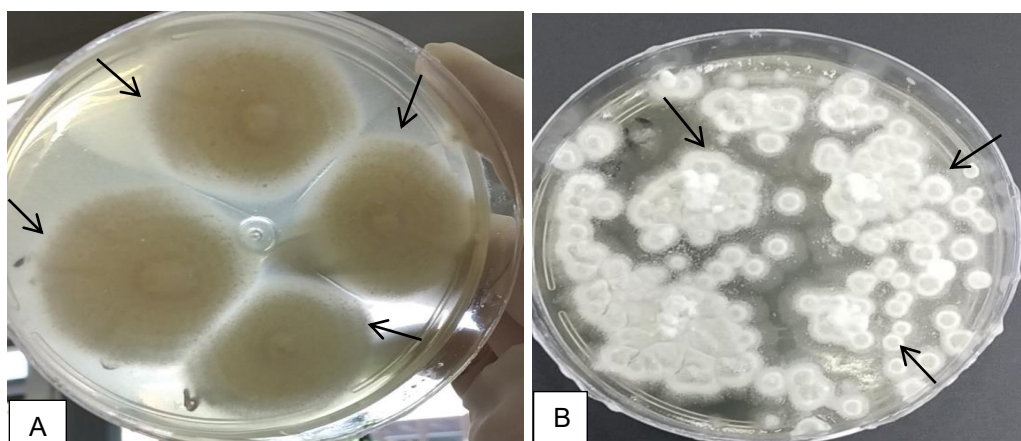
Figura 7 - Presença de halos translúcidos, evidenciando a atividade de lipase em *Aspergillus* sp. (A), *Acremonium* sp. (B) e *Penicillium* sp. (C)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A Lipase 3 apresentou positivos para *Acremonium* sp. e *Penicillium* sp., os resultados foram observados pela formação de halos translúcidos em torno das colônias de fungos (FIGURA 8).

Figura 8 - Presença de halos translúcidos, evidenciando a atividade de lipase em *Acremonium* sp (A) e *Penicillium* sp. (B)

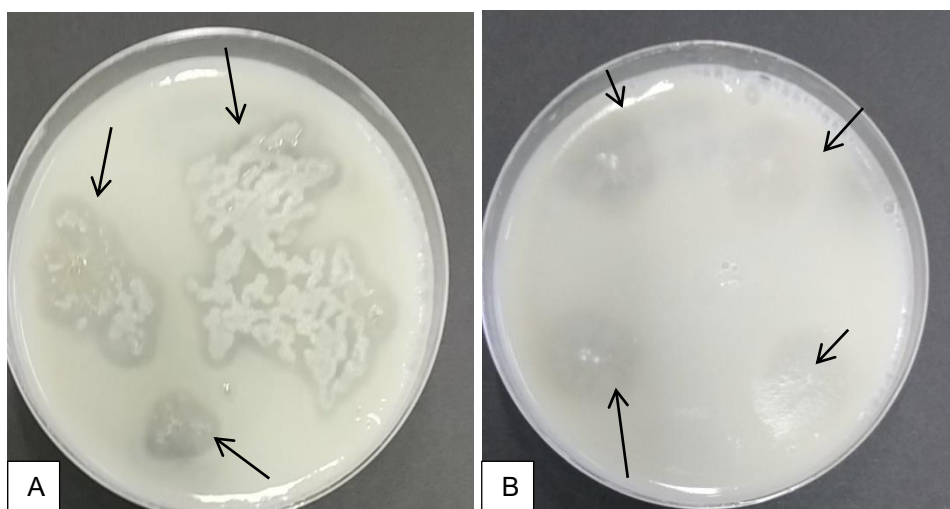


Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

5.2 Protease

A metodologia de protease apresentou positivos para *Acremonium* sp. e *Fusarium* sp. Os resultados foram observados pela formação de halos translúcidos em torno das colônias (FIGURA 9).

Figura 9 - Presença de halos translúcidos, evidenciando a atividade de protease em *Acremonium* sp (A) e *Fusarium* sp. (B)

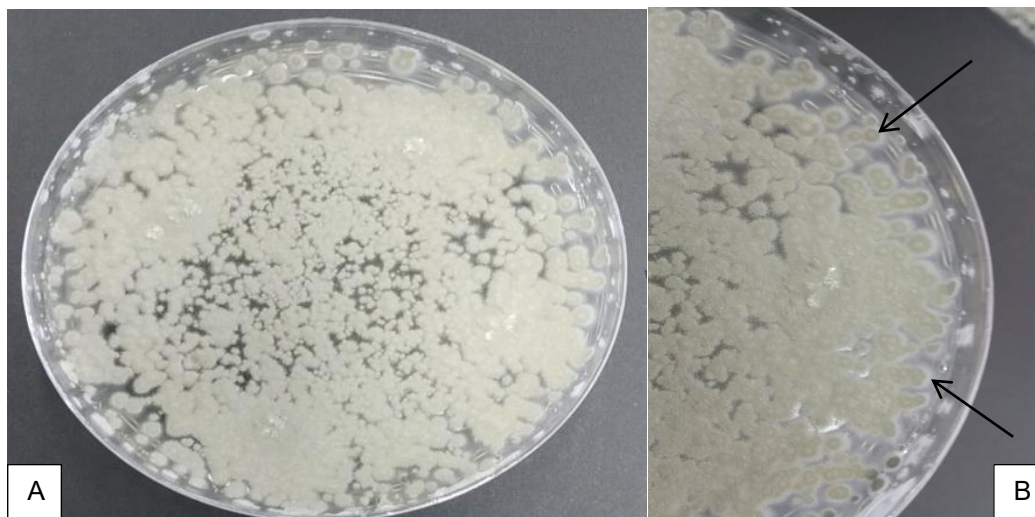


Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

5.3 Quitinase

A metodologia de quitinase apresentou resultado positivo para *Penicillium* sp. Os resultados foram observados pela formação de halos translúcidos em torno das colônias (FIGURA 10).

Figura 10 - Presença de halos translúcidos, evidenciando a atividade de quitinase em *Penicillium* sp. (A) e (B)



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, os resultados obtidos com *Penicillium* sp. corroboram Pinto (2003), que destaca a capacidade de produção enzimática deste gênero, principalmente produção de lipases e proteases. Esses resultados coincidem com os de Lima (2003), onde ele relata várias espécies de *Penicillium* como grandes produtoras de lipases. E como visto nos resultados deste experimento além da produção de lipases houve produção de quitinase.

Conforme descrito por Cuzzi et al. (2011), os isolados de *Fusarium* sp. produziram principalmente lipases, neste trabalho o gênero não apresentou resultado positivo para lipase e sim, para protease, com a metodologia adaptada de (OLIVEIRA et al., 2012).

O *Acremonium* sp. apresentou positividade para as três metodologias de lipases e para de protease, reafirmando o que Cuzzi, et al. (2011) relatou em seu estudo.

Pinto (2003), destacou a eficiência do *Aspergillus* sp. na produção de lipases e proteases, mas como visto neste trabalho o gênero apresentou resultado positivo para uma metodologia de lipase, a qual foi adaptada de (HANKIN, ANAGNOSTAKIS, 1975; FERNANDES, 2009).

7 CONCLUSÃO

A partir das metodologias testadas conclui-se que todos os quatro gêneros de fungos utilizados para este trabalho apresentaram atividades enzimáticas positivas para lipase, protease e quitinase.

O *Acremonium* sp. apresentou positivos para as três metodologias de lipase e para metodologia de protease, o *Aspergillus* sp. apresentou positivo somente para metodologia lipase 2, *Fusarium* sp. apresentou positivo somente para a metodologia protease, enquanto *Penicillium* sp. apresentou positivos para as três metodologias de lipase e para metodologia de quitinase.

Os gêneros *Acremonium* sp. e *Penicillium* sp. foram os dois que mais apresentaram atividade enzimática entre os quatro gêneros testados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2° ed. Piracicaba, 1998.
- BALDONI, D. B. Prospecção de Fungos para Produção de Quitinases por Fermentação em Estado Sólido. **Tese apresentada como parte das exigências ao Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo**, Universidade de Santa Maria, RS, 2016.
- BARATA, R. A. et al. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, n° 4, Aug. 2002.
- BOLDRINI, I.L. et al. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Porto Alegre: Editora Pallotti, 2010.
- BRAZ, S. C. M. De. et al. Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas University Recife Mycology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Recife, jan-fev, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v42n1/v42n1a13.pdf>. Acesso em: 30 out. 2018.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**, 3° ed. Porto Alegre. Artmed Editora, 2000.
- CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para a determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999.
- CUZZI, C. E. et al. Enzimas Extracelulares produzidas por fungos endolíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* d.c. (asteraceae). **Global science and technology**. Universidade Paranaense (UNIPAR), Francisco Beltrão, PR, 2011.
- CHAVES, R. et al. Characterization enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnonology**, Amsterdam, v.123, 2006.
- CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. Itaguaí. 2° ed. UFRJ, 1985.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2°. ed. Revisada e ampliada. Caxias do Sul, 2010.

FAIA, A. M. Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água. **Dissertação apresentada como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia, Universidade de Lisboa** Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, 2011.

FAROOQUI, A.A.; TAYLOR, W.A.; HORROCS, L.A. Phospholipases, lysophospholipases and lipases and their involvement in various diseases. **Neurochemical Pathology**, v.7, 1987.

FERNANDES, A. P. Avaliação do Potencial Enzimático de Fungos Filamentosos Isolados de Diferentes Fontes. **Dissertação apresentada como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos**, Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, 2009.

GALANTE, R.S. Estudos de Quitinases de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauzeiro: purificação, caracterização e modelagem comparativa. **Dissertação apresentada como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana**, 2008.

GUERRA, R. A. T. et al. **Cadernos Cb Virtual 2 – Ciências Biológicas**. João Pessoa: Ed. Universitária, 2011.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, Nov/Dec. 1975.

JAEGER, K.E.; EGGERT. T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol**, v.13, 2002.

JESUS, M. F. C. P. et al. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, 1999.

KHAN.M. T.; ROUFOGALIS; B. D. Understanding the role of proteinases through a ubiquitous enzyme complex, the multicatalytic proteinase (MCP). **Biochem. Edu.**, Oxford, v. 22, 1994.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environment Microbiology**, v. 53, n. 1, 1987.

LIMA, V. M. G. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, 2003.

LUPATINI, M. et al. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal communities in the Pampa biome. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, 2013.

MAIA, M. M. D. et al. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2°. ed. Revisada e ampliada. Lavras, MG. Editora Ufla, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6°. ed. Porto Alegre. Artmed Editora, 2014.

NORTH, M. J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. **Microbiol. Ver.**, Washington, v. 46, 1982.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, 2012.

PARIS, Leandro Daniel de. Produção de Enzimas Fúngicas por Fermentação em Estado Sólido das Sojas Orgânica, Transgênica e Convencional. **Dissertação apresentada como parte das exigências do Curso de Mestrado em Engenharia Química**, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, PR, 2008.

PILLAR, V. P. de. et al. Campos Sulinos: conservação e uso sustentável. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília, 2009.

PINTO, G. A. S. Produção de Tanase por *Aspergillus niger*. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PINTO, A. S. et al. **Controle Biológico de Pragas**. Piracicaba, São Paulo: Prol, Ed. 1ª, 2006.

PUZTKE, J.; PUZTKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. 1° ed. Santa Cruz do Sul. EDUNISC, V. 1998. **Os Reinos dos Fungos**. 2° ed. Santa Cruz do Sul. EDUNISC, v. 1., 2004.

SEJAS, F. Análise e Quantificação de Enzimas Produzidas pelo Fungo Endofítico Entomopatogênico *Paecilomyces* sp. Isolado da Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas**, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

SOARES, V. M. **Padronização de técnica de isolamento e identificação da microbiota fúngica do couro cabeludo e a suscetibilidade à pediculose**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10° ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12° ed. Porto Alegre. Artmed, 2013.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre. Artmed Editora, 2000.



UNIVATES

R. Avelino Tallini, 171 | Bairro Universitário | Lajeado | RS | Brasil
CEP 95900.000 | Cx. Postal 155 | Fone: (51) 3714.7000
www.univates.br | 0800 7 07 08 09